

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-188600
(43)Date of publication of application : 24.07.1990

(51)Int.Cl. C07K 7/10
A61K 37/02
A61K 37/02
A61K 37/02
C07K 7/08
// C07K 99:00

(21)Application number : 01-007944

(71)Applicant : CHUGAI PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 17.01.1989

(72)Inventor : KOISHIHARA YASUO
MURAYAMA EIGOROU
FUKUI HIROYASU

(54) BSF2 ANTAGONIST

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A polypeptide in which plurality of amino acids are lost from N ends and/or C ends of human B cell stimulation factor 2 expressed by the formula, etc., and having antagonism action to the human B cell stimulation factor 2.

USE: A remedy and diagnostic for atrial myxoma, carcinoma of uterine cervix, endotoxin, shock, myeloma, chronic rheumatism, etc.

PREPARATION: For example, a method for successively bonding amino acids whose α -amino groups are protected according to normal Merrifield solid method by BOC method so as to synthesize a peptide chain is used and proceeding of coupling of the protected amino acid is carried out using Kaiser test while monitoring to provide the polypeptide in which plurality of amino acids are lost from N ends and/or C ends of human B cell stimulation factor 2.

PRO PHE PRO SER DAY KED ASP SER LYS ASP YAS
ALA ALA PRO HIS HIS GLN PRO LYS IVA SER SER
GLN ARG PHE ARG LYS GLN HIS ARG IVA ILE LYS
ASP ARG LYS SER ALA ILE KED ARG LYS GLN YAS CYS
ASP LYS SER ARG MET CYS GLN SER IVA LYS GLN
ALA SER GLA GLN SER ASN LYS ASN LYS PRO LYS
NET ALA GLN LYS ARG GLY CYS PRO GLN SER MET
PRO ASN GLD GLD PRO CYS SER VAL ILE ILE ILE
VAL GLN ARG ARG GLN PRO GLN SER IVA ARG CYS
IYM SER GLN ASN GLC PRO KED GLN SER SER GLN
GLN ALA ARG ALA YAS CYS MET SER SER SER YAS
IYM ILE GLN PRO GLN GLN KED LYS IVA ALA LYS ASN
Lys ASP ALA GLD PRO CYS PRO ASN PRO YAS YAS
KED ASN SER LYS LYS LYS GLN GLN ALA CYS
ASN GLN YAS PRO GLN GLN ASN MET YAS PRO PRO LYS
YAS IEN PRO SER PRO LYS GLN PRO LYS GLD GLD
SER GLN ASN ALA LYS ASN GLN MET.

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-188600

⑬ Int. Cl.⁵C 07 K 7/10
A 61 K 37/02C 07 K 7/08
// C 07 K 09:00

識別記号

ZNA
ABG
ABN
ADU

府内整理番号

8318-4H
8615-4C
8615-4C
8318-4H

⑭ 公開 平成2年(1990)7月24日

審査請求 未請求 請求項の数 15 (全 5 頁)

⑮ 発明の名称 B S F : アンタゴニスト

⑯ 特 願 平1-7944

⑰ 出 願 平1(1989)1月17日

⑱ 発明者 小石原 保夫 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
 ⑲ 発明者 村山 肇 五郎 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
 ⑳ 発明者 福井 博泰 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
 ㉑ 出願人 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号
 ㉒ 代理人 弁理士 清浅 勝三 外4名

明細書

1. 【発明の名称】

B S F : アンタゴニスト

2. 【特許請求の範囲】

1. ヒトB細胞型免疫因子2のN末端およびC末端より複数個のアミノ酸が欠損し、かつヒトB細胞型免疫因子2に対し拮抗作用を有するポリペプチド。

2. ポリペプチドがヒトB細胞型免疫因子2のN末端およびC末端より複数個のアミノ酸が欠損したものである請求項1記載のポリペプチド。

3. ポリペプチドのアミノ酸数が20個以上である請求項2記載のポリペプチド。

4. ポリペプチドのアミノ酸数が20乃至40個の範囲である請求項3記載のポリペプチド。

5. ポリペプチドが下記のアミノ酸配列のN末端およびC末端より複数個のアミノ酸が欠損したものである請求項1記載のポリペプチド。

PRO VAL PRO PRO GLY GLU ASP SER LYS ASP VAL
 ALA ALA PRO HIS ARG GLN PRO LEU THR SER SER
 GLU ARG ILE ASP LYS GLN ILE ARG TYR ILE LEU
 ASP GLY ILE SER ALA LEU ARG GLU THR CYS
 ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU
 ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
 MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLU SER GLY
 PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE
 THR GLY LEU LEU GLU PHE GLU VAL TYR LEU GLU
 TYR LEU GLN ASN ARG PHE GLU SER SER GLU CLE
 GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR LYS VAL
 LEU ILE GLN PHE LEU GLM LYS LYS ALA LYS ASN
 LEU ASP ALA ILE THR THR PRO ASP PRO THR THR
 ASN ALA SER LEU LEU THR LYS LEU GLN ALA GLN
 ASN GLN TRP LEU GLN ASP MET THR THR HIS LEU
 ILE LEU ARG SER PHE LYS GLU PHE LEU GLN SER
 SER LEU ARG ALA LEU ARG GLN MET.

6. ポリペプチドが下記のアミノ酸配列の全體、または一部を連続して含むものである請求項1乃至請求項5のいずれかに記載のポリペプチド。

ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
7. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

SER'ALA LEU ARG LYS GLU THR CYS
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN

8. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

THR CYS
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE

9. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

MET CYS GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE

10. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

HET CYS GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU

11. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP

12. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

ASH ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU

13. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE
THR GLY LEU LEU GLU PHE GLU

14. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

GLU SER SER GLU GLU
GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR LYS VAL
LEU ILE GLN PHE LEU GLN LYS LYS ALA LYS ASN
LEU ASN

15. ポリペプチドが該ポリペプチドの構造中の1個または複数個のアミノ酸を他のアミノ酸に置き換えた構造を有するものである請求項1乃至請求項14のいずれかに記載のポリペプチド。

3. [発明の詳細な説明]

＜産業上の利用分野＞

本発明はヒト白細胞刺激因子2(以下「B S F」と称す)に拮抗作用を有するポリペプチドに関する。本発明のポリペプチドは医薬として有用である。

＜従来の技術・発明が解決しようとする課題＞

ヒトB S Fは白細胞の抗体産生細胞への分化を誘導する因子として研究されている。近年になってB S FをコードするcDNAが単離され、cDNA配列に関する情報および構造されたB S Fの部分的なアミノ酸配列等により、B S Fは28

アミノ酸残基のレギナルドペプチドを有する184アミノ酸残基(下記アミノ酸配列(1)で示される)から構成されていることが明らかになった。

アミノ酸配列(1):

PRO YAL PRO PRO GLY GLU ASP SER LYS ASP VAL
ALA ALA PRO HIS ARG GLN PRO LEU THR SER SER
GLU ARG ILE ASP LYS GLN ILE ARG TYR ILE LEU
ASP GLY ILE SER ALA LEU ARG LYS GLU THR CYS
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE
THR GLY LEU LEU GLU PHE GLU VAL TYR LEU GLU
TYR LEU GLN ASN ARG PHE GLU SER SER GLU GLU
GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR LYS VAL
LEU ILE GLN PHE LEU GLN LYS LYS ALA LYS ASN
LEU ASN ALA ILE THR THR PRO ASP PHE THR THR
ASN ALA SER LEU LEU THR LYS LEU GLN ALA GLN
ASN GLN TRP LEU GLN ASP MET THR THR HIS ILE
ILE LEU ARG SER PHE LYS GLU PHE LEU GLN SER
SER LEU ARG ALA LEU ARG GLN MET

最近の追見を総合すると、BSP₁はB細胞に並び產生を誘導し、ハイブリドーマ、プラズマサイドマ、ミエローマ等を増殖させ、HLA (human leukocyte antigen) クラスI抗原の発現を防ぐ事、血清性細胞にコロニーを誘導し、肝臓細胞に急性球蛋白質を誘導し、神経細胞に突起を防ぐ事等にコロニーを誘導し、肝臓細胞に急性球蛋白質を誘導し、神経細胞に突起を防ぐ事等にコロニーを誘導する事等が考えられる。この様にBSP₁は種々の疾患の生理性を有し、広く疾患の増殖に寄与していると考えられている。

一方、BSP₁の異常産生が心筋内膜炎、子宮内膜炎、エンドトキシン・ショック、ミエローマ(骨髄腫)、慢性骨髄リウマチ、キャスルマン症候群等の疾患における先天異常の所因因子である可能性が報告されている(平野ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:2282頁, 1987年)。従ってBSP₁の拮抗剤はこれらの疾患の治療薬または診断薬として期待される。しかしながらBSP₁の拮抗剤に関する報告はこれまで皆無である。

本発明者等はBSP₁の分子構造、とりわけBSP₁が細胞膜上に存在するBSP₁レセプター

のポリペプチドはBSP₁のアミノ酸配列から見た場合、概ね2つの群に大別される。一つの群は下記のアミノ酸配列式(Ⅰ)(この部分は前記アミノ酸配列式(Ⅰ)で示されるポリペプチドのN末端から数えて56～66番目のアミノ酸配列に相当する)

アミノ酸配列式(Ⅰ):

ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN PRO LYS
で示されるポリペプチドの全般、又は一部を過渡して含むものであり、具体的には、例えば以下の(Ⅱ)～(Ⅳ)に示すアミノ酸配列、で示されるポリペプチドである。

アミノ酸配列(Ⅱ):

SEK ALA LEU ARG LYS GLU THR CYS
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN PRO LYS
アミノ酸配列(Ⅲ):

THR CYS
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE

と結合する部分の構造を研究する過程において、BSP₁のN末端およびC末端より複数個のアミノ酸が欠損したポリペプチドがBSP₁に対し拮抗作用を有することを見い出した。BSP₁の一部を構成するポリペプチドがBSP₁に対し拮抗的に作用することは従来全く知られていない新発見である。本発明はこの如見に鑑み更に検討を加えて完成したもので、BSP₁に対し拮抗作用を有するポリペプチドに関するものである。このようなポリペプチドはBSP₁が主因となっていいる疾患、例えば慢性骨髄リウマチ、ミエローマ(骨髄腫)、あるいはエンドトキシン・ショック治療薬として有用である。

＜課題を解決するための手段＞

本発明のBSP₁に対するポリペプチドは、前記式(Ⅰ)で示すBSP₁アミノ酸配列式のN末端および/またはC末端より複数個のアミノ酸が欠損したものである。このポリペプチドはアミノ酸数が20～40個よりなるものであるが、特にこのアミノ酸数は固定されるものではない。本発明

アミノ酸配列(Ⅴ):

MET CYS GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE

アミノ酸配列(Ⅵ):

MET CYS GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY
PHE ASN GLU GLU TRA CYS LEU

アミノ酸配列(Ⅶ):

GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP

アミノ酸配列(Ⅷ):

ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU

また本発明は、これらの他に例えば以下に示す(Ⅱ)および(Ⅲ)といったポリペプチドをも包含する。これらは前記アミノ酸配列(Ⅰ)の部分構造を

育していないポリペプチドである。

アミノ酸(II):

PHE ASN GLU GLD THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE
THR GLY LEU LEU GLU PHE GLU

アミノ酸配列(III):

GLU SER SER GLU GLU
GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR LYS VAL
LEU ILE GLN PHE LEU GLN LYS LYS ALA LYS ASN
LEU ASP

なお、本発明は、これらのポリペプチドに限定されるものではない。つまりある特定のポリペプチドの一箇もしくは複数箇のアミノ酸が他のアミノ酸に置き換わられた場合、またはこれらのアミノ酸が欠損した場合においても、ほぼ同様かそれ以上の活性を示すことはよく知られているところである。本発明においても同様に、前述したアミノ酸配列(II)～(X)に示すポリペプチドまたはアミノ酸配列(1)で示されるB-S-F₂の一部を構成するポリペプチドの一箇もしくは複数箇のアミノ酸を他のアミノ酸に置き換えたもの、または欠損

ムを用いて0.1%TPA存在下、アセトニトリルを0%～70%のリニアグラジエント(linear gradient)を2.5分間で展開し(*flow rate=1 ml/min*)、260nmの紫外外部吸収によりモニターした結果である。

したものであっても本質的にB-S-F₂の割合構造を含有し、かつB-S-F₂に対し拮抗作用を有するポリペプチドは本発明に係るポリペプチドである。

本発明のポリペプチドは、その構成アミノ酸数が20～40個程度であり、特に粗粗なDNA技術を用いることなく、化學合成することができる。ペプチド合成は通常のMerrifield固相法(j. Med. Chem., 1979, 22, 586～588)に従ってB-S-F₂により行った。カップリングの進行はKaiser試験(Anal. Biochem., 1970, 34, 585～588)を用いてモニターした。

以下本発明において製造した前記(II)～(X)のアミノ酸配列を有するポリペプチドのアミノ酸分析の結果およびHPLC(高圧液体クロマトグラフィー)分析の結果を表1に示す。なお、アミノ酸分析は本発明のポリペプチドを6N HClで120℃、1.5時間加水分解した後アミノ酸分析機MLC-203システム3(A.T.T.O.社製)を用い常法に従って実施したものであり、HPLC分析はYMC-R&D(5 microns)(日本分光社製)カラ

表 1

ボリペプチド No.	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	(VIII)	(IX)	(X)
ASP	3.8(4)	8.0(8)	4.0(4)	5.3(5)	4.0(4)	5.0(5)	1.2(1)	2.0(2)
GLU	4.2(4)	4.0(4)	4.0(4)	8.7(7)	3.7(4)	4.0(4)	3.7(4)	6.8(7)
SER	4.0(4)	2.7(3)	1.8(2)	2.6(3)	1.7(2)	1.2(1)		3.0(3)
GLY		1.2(1)	1.1(1)	2.3(2)	1.1(1)	2.3(2)	1.1(1)	
ARG	1.0(1)							1.0(1)
THR	0.9(1)	0.6(1)		1.0(1)		1.0(1)	2.0(2)	1.0(1)
ALA	2.2(8)	8.0(8)	8.0(8)	2.8(3)	8.2(3)	1.1(1)		2.8(8)
PRO		1.1(1)	1.0(1)	1.1(1)	1.1(1)	1.0(1)		
VAL							1.1(1)	2.1(2)
ME?	1.1(1)	2.0(2)	1.8(2)	1.7(2)	1.0(1)	0.9(1)		1.1(1)
CYS	x(2)	x(2)	x(2)	x(3)		x(2)	x(1)	
ILE							1.4(2)	1.0(1)
LEU	2.1(2)	8.3(3)	8.0(3)	4.0(4)	3.0(3)	8.0(3)	3.1(3)	8.0(3)
PHE		1.8(1)	0.9(1)	1.7(2)		2.3(2)	2.1(2)	1.1(1)
LYS	2.8(2)	4.8(4)	2.8(3)	3.1(3)	2.8(3)	2.1(2)	1.0(1)	4.0(4)
Retention Time(min)	24.25	17.08	15.27	17.99	15.85	29.04	27.38	19.77

表中のボリペプチドのNo. は前述の各アミノ酸配列のNo. に対応している。()内は推定されるアミノ酸数である。またx印はカウントされないものである。

次に本発明のボリペプチドのBSPに対する拮抗作用を示す。拮抗作用は96穴のマイクロプレートの各ウェルに 1×10^{-4} MのSKW6 CL-4(CL-4あるいはCES)細胞あるいはCES細胞を加え、適量のBSPと共に5日間、CO₂中イシキュベーター中で培養する。培養上清を落め、上清中に含まれる抗体(CL-4はIgM抗体を、CESはIgM抗体を発生する)量をELISA法により定量する。本発明のボリペプチドのBSPに対する拮抗作用を調べる目的には本発明のボリペプチドを最終濃度 1.0^{-4} ~ 1.0^{-11} Mの濃度範囲になるように適宜希釈し、BSPを添加する30分前に加えて細胞と予め反応させる。本発明のボリペプチドの添加による抗体産生粗率は次式により算出した。

$$\text{粗率}(\%) = \left(\frac{\text{本発明のボリペプチド添加時の抗体量}}{\text{本発明のボリペプチド非添加時の抗体量}} \right) \times 100$$

その結果を次の表2に示す。なお表中の本発明のボリペプチドのNo. は前記第1表におけるボリペプチドに対応している。

表 2

ボリペプチド No.	粗率(%)	
	CL-4	CES
(III)	82%(11)	89%(8)
(IV)	—	42%(9)
(V)	37%(12)	33%(11)
(VI)	62%(12)	59%(8)
(VII)	43%(10)	60%(13)
(VIII)	47%(11)	81%(11)
(IX)	43%(10)	48%(7)
(X)	76%(97)	87%(97)

表2に示すように本発明ボリペプチドはBSPより誘導されるCL-4あるいはCES細胞の抗体産生に対する拮抗作用を有している。

〈発明の効果〉

本発明に係る種々のポリペプチドは、B S F₁に対して拮抗剤として作用する。更って、これらのポリペプチドは、B S F₁の異常発生によって引き起こされると考えられている心房内粘液症、子宮内膜症、エンドトキシン・ショック、ミエローマ(骨腫瘍)、慢性闘病リウマチ、キャスルマン症候群等の免疫異常疾患に対する治療あるいは診断として利用することが期待されることから、本発明はこの種の免疫異常疾患に対する新たな治療及び診断への道を開くものとして医薬産業上きわめて有用である。

特許出願人 中外製薬株式会社

代理人 井原士 遠藤義三
(外4名)